

钙对杂交水稻离体叶片衰老的影响^{*}

段咏新 宋松泉 傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 以叶绿素和蛋白质的质量分数下降作为衰老的生理指标,研究了 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 的螯合剂 EDTA对杂交水稻离体叶片衰老的作用. 结果表明, Ca^{2+} 能延缓杂交水稻离体叶片中叶绿素和蛋白质的质量分数的下降, 提高超氧化物歧化酶 (SOD) 过氧化氢酶 (CAT) 抗坏血酸过氧化物酶 (AsA-POD) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 的酶活性; 增加抗坏血酸 (AsA) 和谷胱甘肽 (GSH) 的质量分数; 降低膜脂过氧化产物丙二醛 (MDA) 的质量摩尔浓度. $1\sim 20\text{ mmol/L}$ EDTA降低叶片中叶绿素和可溶性蛋白质的质量分数; 降低 AsA-POD和 CAT的酶活性; 降低 AsA GSH的质量分数; 提高 SOD酶活性, 但对 GR酶活性的影响不大. 外加 Ca^{2+} 可使 EDTA的抑制作用减轻.

关键词 衰老, Ca^{2+} , EDTA, 活性氧防御系统, 杂交水稻

分类号 Q 945.6

杂交水稻连体叶片衰老时叶绿素和蛋白质的质量分数 (叶片质量以干质量计, 下同) 下降, 超氧化物歧化酶 (SOD) 酶活性发生变化, 膜脂过氧化产物丙二醛 (MDA) 和脂质过氧化物的质量分数增加^[1]. 在始穗期用 15 mmol/L Ca^{2+} 喷施叶面, 能延缓主茎旗叶衰老^[2]. Ca^{2+} 也能延缓豇豆叶片衰老^[3]. 本文以杂交水稻离体叶片为材料, 研究了 Ca^{2+} 对叶片衰老的作用及其与活性氧防御系统的关系.

1 材料与方方法

供试材料为杂交水稻汕优 63 (*Oryza sativa* L cv. Shanyou 63). 种子经 HgCl_2 消毒后, 28°C 恒温催芽, 然后播种于网室塑料桶中 (每桶 10 kg 泥土, 2 g 尿素, 2 g KH_2PO_4), 自然光照和温度, 待水稻幼苗长至 4叶时, 取第 3叶, 叶片两端各去掉 3 cm , 然后切成 1 cm 片段, 让其漂浮于水或处理溶液中, 室温下自然衰老. 在处理第 3天取样作各项测定.

w (叶绿素) 的测定参照 Arnon (1949) 方法; w (可溶性蛋白) 的测定按 Bradford (1976) 的方法; b (MDA) (以每 g 蛋白质中 MDA 的 nmol 数表示, 单位为 nmol g^{-1} , 下同) 的测定参照 Heath 等的方法^[4]; SOD 酶比活性 $[\lambda$ (SOD)], 以每 g 干质量中 SOD 的酶活性表示, 单位为 $\text{nmol s}^{-1} \text{g}^{-1}$, 下同 测定参照王爱国等的方法^[5]; 过氧化氢酶 (CAT) 酶比活性 $[\lambda$ (CAT)] 测定 Hugo (1983) 的方法; 谷胱甘肽还原酶 (GR) 酶比活性 $[\lambda$ (GR)] ($\mu\text{ mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), 下

* 国家自然科学基金 (39370069) 资助项目

收稿日期: 1997-10-24 段咏新, 女, 3岁, 讲师

同]测定参照王以柔等的方法^[6];抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)酶比活性 λ (AsA-POD)测定参照 Nakano 等(1981)的方法; w (AsA)和谷胱甘肽(GSH)的质量分数 $[w$ (GSH)]测定参照曾韶西等(1987)的方法.

2 实验结果

2.1 Ca^{2+} 对杂交水稻离体叶片衰老的作用

2.1.1 Ca^{2+} 对 w (叶绿素)和 w (蛋白质)的影响 对照叶片的 w (叶绿素)和 w (蛋白质)分别为 8.79×10^{-3} 和 2.48×10^{-3} . w (叶绿素)和 w (蛋白质)的降低是叶片衰老的标志. 低浓度 Ca^{2+} 能延缓离体叶片 w (叶绿素)和 w (蛋白质)的消失, $0.1 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$ 处理的 w (叶绿素)和 w (蛋白质)比对照高 33.90% 和 78.56%, 1 mmol/L Ca^{2+} 处理的 w (叶绿素)和 w (蛋白质)比对照高 14.68% 和 134.58% (图 1).

2.1.2 Ca^{2+} 对活性氧防御酶活性和抗氧化剂含量的作用 由表可以看出, Ca^{2+} 能提高离体叶片中 λ (SOD), λ (CAT), λ (GR) 和 λ (AsA-POD). 当 $c(\text{Ca}^{2+})$ 为 0.1 mmol/L 时, SOD, CAT 和 GR 的 λ 最高, 分别比对照提高了 142.13%, 206.56%, 59.34%; $c(\text{Ca}^{2+})$ 超过 1 mmol/L 时, 除 AsA-POD 外, 其余 λ 不同程度的降低. $c(\text{Ca}^{2+})$ 在 $0.01 \sim 1 \text{ mmol/L}$ 范围内, 叶片中抗氧化剂 w (AsA), w (GSH) 随 $c(\text{Ca}^{2+})$ 的增加而上升.

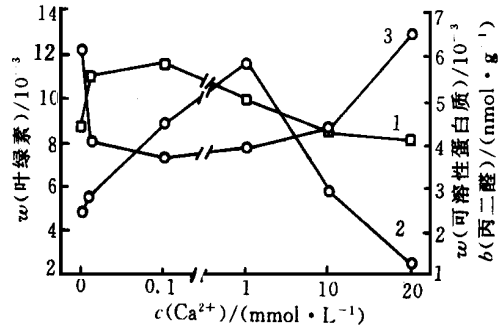


图 1 Ca^{2+} 对杂交水稻离体叶片中 w (叶绿素)、 w (蛋白质)和 b (丙二醛)的影响

Fig. 1 Effect of Ca^{2+} on the contents of chlorophyll, soluble protein and malondialdehyde in detached leaves of hybrid rice
1 叶绿素; 2 可溶性蛋白; 3 丙二醛

表 1 Ca^{2+} 对杂交水稻离体叶片活性氧防御酶系统和抗氧化剂质量分数的影响

Tab. 1 Effect of Ca^{2+} on protective enzyme system of active oxygen and antioxidants levels in detached leaves of hybrid rice

项 目	$c(\text{Ca}^{2+}) / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$					
	0	0.01	0.1	1	10	20
$\lambda(\text{SOD}) / (\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1})$	607.45	1361.11	1470.79	790.32	621.96	600.62
$\lambda(\text{CAT}) / (\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	266.05	386.74	815.66	454.26	426.75	242.72
$\lambda(\text{GR}) / (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	14.78	15.37	23.55	21.48	9.85	6.70
$\lambda(\text{AsA-POD}) / (\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	466.59	476.76	491.43	510.77	434.07	427.92
$w(\text{AsA}) / 10^{-6}$	409.20	423.19	451.05	654.72	522.40	332.48
$w(\text{GSH}) / 10^{-6}$	50.20	65.20	80.10	220.30	162.42	67.70

2.1.3 b (MDA)的变化 MDA 是脂质过氧化的主要产物之一, 且对植物细胞有明显的毒害作用. 叶片衰老时, 脂质过氧化作用加强, Ca^{2+} 能显著降低 b (MDA), 当 $c(\text{Ca}^{2+})$ 为 0.1 mmol/L 时, b (MDA)最低, 比对照降低了 40% (图 1).

2.2 Ca^{2+} 螯合剂 EDTA 对杂交水稻离体叶片衰老的作用

2.2.1 EDTA 对杂交水稻离体叶片 w (叶绿素)、 w (蛋白质)和 b (MDA)的影响 EDTA 为 Ca^{2+} 的螯合剂. 用 1~20 mmol/L EDTA 处理离体叶片, w (叶绿素)和 w (蛋白质)均比对照降低, 其 w 随着 c (EDTA)的增大而逐渐下降. b (MDA)随着 c (EDTA)的升高而逐渐增加. 加入外源 Ca^{2+} 可拮抗 EDTA 的效应, 对叶绿素而言, 0.1 mmol/L Ca^{2+} 处理的效应大于 1 mmol/L Ca^{2+} 处理; 对蛋白质而言, 1 mmol/L Ca^{2+} 处理的效应大于 0.1 mmol/L Ca^{2+} . 外加 Ca^{2+} 也能降低 EDTA 促进 MDA 生成的作用, 0.1 mmol/L Ca^{2+} 的作用大于 1 mmol/L Ca^{2+} (表 2).

表 2 EDTA 和 EDTA+ Ca^{2+} 对杂交水稻离体叶片 w (叶绿素)、 w (蛋白质)和 b (丙二醛)的影响

Tab. 2 Effects of EDTA and EDTA+ Ca^{2+} on contents of chlorophyll soluble protein and MDA in detached leaves of hybrid rice

c (EDTA) (mmol L ⁻¹)	w (叶绿素) 10 ⁻³	w (蛋白质) 10 ⁻³	b (MDA) (nmol g ⁻¹)	c (EDTA)+ c (Ca^{2+}) (mmol L ⁻¹)	w (叶绿素) 10 ⁻³	w (蛋白质) 10 ⁻³	b (MDA) (nmol g ⁻¹)
0	8.79	2.48	6.32	0+ 0.1	11.77	4.43	3.79
1	7.67	1.89	10.16	1+ 0.1	10.92	4.19	2.67
5	5.27	1.58	12.90	5+ 0.1	8.47	2.96	1.88
10	4.26	0.91	19.13	10+ 0.1	5.78	2.60	1.34
20	2.98	0.63	22.18	20+ 0.1	4.13	2.18	0.92
				0+ 1	10.08	5.82	3.99
				1+ 1	8.06	4.72	2.35
				5+ 1	7.59	4.15	1.50
				10+ 1	4.92	3.85	0.98
				20+ 1	3.04	2.86	0.69

2.2.2 EDTA 对杂交水稻离体叶片活性氧防御酶系统和抗氧化剂质量分数的作用 1~20 mmol/L EDTA 能提高离体叶片 λ (SOD), 外加 Ca^{2+} 能进一步提高 λ (SOD), 0.1 mmol/L Ca^{2+} 的作用大于 1 mmol/L Ca^{2+} . 1~20 mmol/L EDTA 能降低 λ (AsA-POD), 加入外源 Ca^{2+} , λ (AsA-POD)提高, EDTA 能降低 λ (CAT)酶活性, 外加 Ca^{2+} 能提高 λ (CAT); 不同浓度的 EDTA 对 λ (GR)影响不大, Ca^{2+} 能提高 λ (GR). EDTA 能降低 w (AsA)和 w (GSH), Ca^{2+} 能使 EDTA 的抑制作用减轻, 1 mmol/L Ca^{2+} 的作用大于 0.1 mmol/L Ca^{2+} (表 3).

3 讨论

衰老的自由基理论认为, 衰老过程是细胞和组织不断产生自由基和体内清除自由基系统不平衡导致自由基损伤反应的总和. 杂交水稻叶片衰老时叶绿素和蛋白质含量下降, SOD 酶活性则先增加然后下降, b (MDA)显著增高^[1]. 植物在衰老过程中, 活性氧增加, 植物细胞中存在对氧化胁迫感知并作出反应的机制, 即氧化应激机制 (oxidative-stress response), 能很快地诱导出很多基因产物^[7]. Bowler 等 (1992) 认为活性氧清除酶的生物合成通常受细胞内底物水平的调控. Rabinowitch 等 (1983) 发现: O_2^- 水平提高时, SOD 活性也随之增加. 因此可以认为活性氧的伤害是叶片衰老的主要原因之一.

Ca^{2+} 能延缓杂交水稻离体叶片中 w (叶绿素)和 w (蛋白质)的消失 (图 1); 提高活性氧防

御酶的酶活性和抗氧化剂的质量分数 (表 1); 降低膜脂过氧化产物 MDA 的质量摩尔浓度 (图 1). Ca^{2+} 螯合剂 EDTA 促进离体叶片衰老 (表 2), 增加 b (MDA) (表 2); Ca^{2+} 对 EDTA 具有拮抗作用 (表 2, 3). 这些都说明, Ca^{2+} 是通过提高活性氧防御酶的酶活性和抗氧化剂质量分数来延缓叶片衰老. Xu 等 (1993) 发现外加 Ca^{2+} 可刺激花生细胞向培养基分泌过氧化物酶; 酶光谱分析结果表明, Ca^{2+} 可能参与酶活性部位的组成. Price 等^[8] 证明细胞传递氧化胁迫的信号是通过钙的胞内信使起作用, 从而调节细胞生长发育. 衰老是一种复杂的生理过程, 活性氧作为第二信使 (孙玉和陈珈, 1997). 活性氧及其防御系统与已知的 Ca^{2+} 信号转导途径在调节植物衰老中的作用及其相互关系将会成为这一领域的研究热点.

表 3 EDTA 和 EDTA+ Ca^{2+} 对杂交水稻离体叶片
活性氧防御酶系统和抗氧化剂质量分数的影响

Tab. 3 Effects of EDTA and EDTA+ Ca^{2+} on the defense enzyme system of active oxygen and antioxidants levels in detached leaves of hybrid rice

c (mmol L ⁻¹)	λ (SOD) (nmol s ⁻¹ g ⁻¹)	λ (CAT) (nmol s ⁻¹ g ⁻¹)	λ (GR) (μ mol min ⁻¹ g ⁻¹)	λ (AsA-POD) (nmol s ⁻¹ g ⁻¹)	w (AsA) 10 ⁻⁶	w (GSH) 10 ⁻⁶
EDTA						
0	607.45	266.05	14.78	466.59	409.20	50.20
1	850.500	181.20	14.54	334.90	316.15	48.89
5	922.02	151.36	14.12	270.55	198.22	37.04
10	983.36	136.53	13.97	258.88	96.61	29.63
20	1 002.20	104.19	13.86	251.55	65.32	17.54
EDTA+ Ca^{2+}						
0- 0.1	1 470.79	815.66	23.55	491.43	451.05	80.10
1- 0.1	1 592.82	584.78	21.36	442.59	342.97	69.75
5- 0.1	1 767.69	525.11	20.44	363.67	214.01	41.87
10- 0.1	2 022.24	285.22	19.24	349.24	95.31	39.56
20- 0.1	2 154.60	187.70	15.14	314.23	72.58	26.47
0- 1	790.32	454.26	21.48	510.77	654.72	220.30
1- 1	980.03	331.07	20.55	460.26	545.82	180.02
5- 1	1 341.27	171.87	17.06	409.25	335.71	149.42
10- 1	1 544.81	158.20	15.23	354.57	151.77	124.18
20- 1	1 649.33	147.53	14.84	348.57	112.34	88.71

参 考 文 献

- 1 宋松泉, 傅家瑞. 杂交水稻叶片衰老与膜脂过氧化作用的关系. 中山大学学报论丛, 1995(1): 15~19
- 2 宋松泉, 蒋明兰, 彭晓南. Ca^{2+} 对杂交水稻抽穗结实期叶片衰老和谷产量的作用研究. 中山大学学报论丛, 1995(1): 29~33
- 3 Swamy P M, Suguna P. Influence of calcium chloride and benzyladenine on lipoxygenase of *Vigna unguiculata* leaf discs during senescence. Plant Physiol, 1992, 84: 467~471
- 4 Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys, 1968, 125: 189~198

- 5 王爱国,罗广华,邵从本,等.大豆种子超氧化物歧化酶的研究.植物生理学报,1983,9: 77~ 84
- 6 王以柔,刘鸿先,李平等.低温对水稻幼苗中谷胱甘肽含量及谷胱甘肽还原酶活性的影响.中国科学院华南植物研究所集刊,1989,4: 153~ 159
- 7 陈璠,周玫.氧化应激与原核基因表达的调控.生命的化学,1994,14(6): 3~ 6
- 8 Price A H, Taylor A, Ripley S J, et al. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. Plant Cell, 1994, 6: 65~ 74

Effects of Calcium on Senescence in Detached Leaves of Hybrid Rice

Duan Yongxin* Song Songquan Fu Jiarui

Abstract Effects of Ca^{2+} and $\text{Ca}^{2+} + \text{EDTA}$ on senescence in detached leaves of hybrid rice were studied using contents of chlorophyll and soluble protein as the physiological indexes. The results show that Ca^{2+} could slow down the loss of chlorophyll and soluble protein, increase the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbic acid peroxidase (AsA-POD) and glutathione reductase (GR), and raise the contents of ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH), and decrease malondialdehyde (MDA) content. The activities of AsA-POD and CAT, and the contents of chlorophyll, soluble protein, AsA and GSH reduced by 1~20 mmol/L EDTA. In the meantime, the activity of SOD increased, and GR activity was less affected. External Ca^{2+} could weaken the effect of EDTA, and effect of 1 mmol/L Ca^{2+} was larger than that of 0.1 mmol/L Ca^{2+} .

Keywords senescence, Ca^{2+} , EDTA, defense system of active oxygen, hybrid rice

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China